

Untersuchungen über die
Thrombocyten-Adhäsion
vergleichend mit der
Kapillar- und Kolbenmethode

Eva Köhl

1960

AUS DER I. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor : Professor Dr. SCHWIEGK

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE THROMBOCYTEN-ADHÄSION

vergleichend mit der

KAPILLAR- und KOLBENMETHODE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der

Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

E v a K ö h l

aus Lößnitz / Erzgebirge

München 1960

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Referent: Priv.Doiz.Dr.R. M a r x

Correferent: Professor Dr.H. S c h w i e g k

Dekan: Professor Dr.Dr. H. E y e r

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 12. 1960



INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG

1. ALLGEMEIN

1.1. Zweck und Umfang

1.2. Begriffsbestimmungen

1.3. Abgrenzung gegenüber anderen Vorschriften

1.4. Geltungsbereich

2. FÜR LEA

2.1. Zielsetzung

2.2. Grundsätze

2.3. Verfahren

2.4. Dokumentation

2.5. Berichterstattung

2.6. Sonstige Bestimmungen

3. ANHANG

3.1. Abkürzungen

3.2. Literaturverzeichnis

3.3. Glossar

3.4. Sonstige Angaben

3.5. Sonstige Angaben

3.6. Sonstige Angaben

3.7. Sonstige Angaben

3.8. Sonstige Angaben

3.9. Sonstige Angaben

3.10. Sonstige Angaben

3.11. Sonstige Angaben

4. SONSTIGE ANGABEN

5. SONSTIGE ANGABEN

5.1. Sonstige Angaben

5.2. Sonstige Angaben

5.3. Sonstige Angaben

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. EINLEITUNG	7
B. METHODIK	
Prinzip der Methode	9
Einzelheiten über die Apparaturen zur Messung der Thrombocyten-Adhäsion	9
a) Kapillaradhäsiometer nach MARX-DERLATH	9
b) Kolbenrotationsapparat nach JÜRGENS	10
Einzelheiten des Versuchsganges	10
a) Bestimmung des Thrombocyten- Ausgangswertes	10
b) Versuchsgang bei der Kolben- rotations-Methode	12
c) Versuchsgang bei der Kapillar- methode	12
d) Reinigung der Apparaturen	15
C. ERGEBNISSE	16
Untersuchung methodisch bedingter Fehlerquellen	16
a) Fehlerbreite bei Bestimmung des Thrombocyten-Ausgangswertes	16
b) Fehler durch Schwankung der Plättchenzahl	17
Vergleichende Messungen der Thrombocyten- Adhäsion	19
a) Versuche mit Citrat-Blut	19
b) Versuche mit Citrat-Plasma	21
c) Citratblutversuche mit Zusatz von Panthesin	23
D. ZUSAMMENFASSENDE BEURTEILUNG	25
E. DISKUSSION	28
Vergleich beider Methoden	28
Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Autoren	30

A. E I N L E I T U N G

Zu den routinemässigen Laboruntersuchungen des Blutes gehört heute nicht nur die zahlenmässige Bestimmung der Blutkörperchen/cmm, sondern mehr und mehr auch die Erfassung ihrer Eigenschaften. Die Kliniker fordern zur Aufklärung bestimmter Blutkrankheiten oder zur Prüfung besonderer Medikamente leicht zu handhabende Methoden, die eine Aussage über normales oder pathologisches Verhalten der Blutkörperchen und dessen Beeinflussbarkeit erlauben.

Von den Haupteigenschaften der *T h r o m b o c y t e n*, von Adhäsion, Evolution, Retraktionsinduzierung, Agglomeration und Agglutination, wird isoliert die erstere mit zwei verschiedenen Nachweismethoden im Vergleich untersucht.

Die dazu benutzten Apparaturen - im Prinzip eine Kapillare und ein Kolben, die von Blut durchströmt werden - gehen von der theoretischen Vorstellung aus (MARX), dass die dabei auftretenden Strömungsverhältnisse einerseits denen in Herz und herznahen Gefäßen und andererseits der Kreislaufperipherie in etwa vergleichbar seien.

Andere beschriebene Methoden, wie direktes Auszählen haftender Thrombocyten auf bestimmten Testoberflächen (HILLIG, KREITER) oder Plättchenverlust nach Passage des Blutes durch Glaswolle (MOLTEN und VROMAN), erscheinen zur quantitativen Erfassung der Adhäsion nicht so geeignet.

H.P.WHRIGT liess mit Oxalatblut gefüllte Glaskugeln auf einer Holzscheibe rotieren. J. JÜRGENS modifizierte diese Methode zum genannten Kolbensystem.

ROVATTI benutzte bereits bei seinen Versuchen Leukocytenpipetten, in die Blut aufgesaugt und wieder ausgeblasen wurde. MARX und DERLATH entwickelten daraus das zu unseren Untersuchungen verwendete Kapillar-Adhäsionsmeter.

Obwohl die Adhäsion an gefässfremden Oberflächen ausgelöst und indirekt als Plättchenverlust bestimmt wird, sind die Resultate durchaus verwertbar, wenn sie - wie eine Grosszahl klinischer Nachweismethoden, die auf indirekten Messungen beruhen - nur im Vergleich zu normalem Verhalten betrachtet werden.

B. M E T H O D I K

Prinzip der Methode.

Die Thrombocyten-Adhäsion wurde indirekt gemessen durch Bestimmung der Plättchenzahl in einer Volumeneinheit Blut oder Plasma vor und nach Berührung mit einer definierten Oberfläche, wobei mehr oder weniger Thrombocyten daran haften blieben. Zwei verschiedene Hohlraumsysteme - ein Kapillar- und ein Kolbensystem - wurden dazu vergleichend als Adhäsions-Testoberflächen benutzt.

Einzelheiten über die Apparaturen.

a) Kapillar-Adhäsionometer nach MARX-DERLATH:

Es handelt sich hierbei um eine Glaskapillare von 50 cm Länge und 1,0 mm lichter Weite. Sie ist von einem zylinderförmigen Wasserbad eingemantelt, das durch Elektroheizung auf gewünschte Temperaturen gebracht werden kann. Als Halterung dient eine an einem Stativ befestigte Holzscheibe, die mit einer Winkeleinteilung versehen ist. Diese Scheibe samt Kapillare lässt sich in ihrem Mittelpunkt um eine zu ihr senkrecht laufende Achse drehen. Auf diese Weise kann beim Versuch eine in die Kapillare eingebrachte Blut- oder Plasmamenge unter einem einstellbaren, definierten Neigungswinkel durch Heben und Senken der Kapillare zum Strömen gebracht werden

b) Kolbenrotationsapparat nach JÜRGENS:

Ein 10 ml-Glaskolben sitzt der Achse eines Elektromotors mit seinem Halsteil auf und wird mit 32 U/min gedreht. Der Motor ist so an ein Wasserbad mit Thermostat montiert, dass der Kolben unter einem Winkel von 45° in dieses eintaucht. Durch den Thermostat (BÜHLER-Kleinthermostat) kann in den Kolben eingebrachtes Blut oder Plasma (= o.Pl.) auf bestimmter Temperatur mit einer Toleranz von $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ gehalten werden.

Auf Vorschlag von R.MARX wurde eine neuartige Kolbenhalterungsplatte angefertigt, die es ermöglicht, gleichzeitig drei Kolben rotieren zu lassen.

Einzelheiten des Versuchsganges.

Der Versuchsperson wurden mit silikonierter (s.Anmerkung 1) V₂A-Stahlkanüle Nr.1 und Glasspritze aus der v.cubitalis 3-5 ml Blut entnommen und mit dem in der Spritze vorgelegten Natriumzitrat (3,8 %ige Lösung) im Verhältnis 1:4 gemischt (für Versuche mit Plasma zur Vergleichsmöglichkeit nach Angabe von JÜRGENS im Verhältnis 1:9).

a) Bestimmung des Thrombocyten-Ausgangswertes:

Sofort nach Blutentnahme wurde mit dem gut durchmischten Citratblut eine Leukocytenpipette bis zur Marke 0,5 gefüllt und mit 2 %igem Novocain bis zur Marke 11 verdünnt.

In der Pipette blieb das Testblut 10 min liegen und wurde dann gut durchmischt - nach Verwerfen der ersten Tropfen - in zwei Neubauer-Zählkammern eingebracht. Diese kamen für mindestens 10 min in eine feuchte Kammer zur Sedimentation der Plättchen.

Zur Bestimmung des Thrombocyten-Ausgangswertes wurden im Phasenkontrastmikroskop (Objektiv 20-fach, Okular 12,5-fach) je 10 mittlere Quadrate der beiden Kammern ausgezählt. Der jeweils ermittelte Wert ergab mit dem Faktor 600 multipliziert die Plättchenzahl/mm³ Testblut. Das Mittel beider Zahlen wurde als Ausgangswert (= 100 %) festgelegt. Für die Thrombocytenzählung in Plasma, das durch 5-10 min langes Zentrifugieren bei ca. 1000 U/min gewonnen wurde, galt das gleiche.

Anmerkung 1 : Silikonierung von Kanülen, Spritzen und Gläsern:

Kanülen wurden in einer Lösung von 0,5 Teilen MONOCOTE in 99,5 Teilen aqua dest. 3 min gekocht und anschliessend getrocknet (nach dreimaligem Gebrauch erneute Silikonierung.). Glasspritzen und Reagenzgläser wurden in einer Lösung von 6 Teilen Silikonimprägnierungsmittel WS 70 WACKER in 94 Teilen Reinbenzin getaucht und anschliessend 60 min auf 200°C erhitzt. Die Silikonbehandlung wurde wiederholt, wenn nach erneutem Erhitzen (Sterilisation) die abstossende Wirkung bei Prüfung mit destilliertem Wasser nicht wieder voll zutage trat.

b) Versuchsgang bei der Kolbenrotationsmethode:

War dem Testblut (o.Pl.) eine Probe zur Bestimmung des Plättchenausgangswertes entnommen, so wurden 2 ml Blut (o.Pl.) in den rotierenden Kolben gebracht, der Rest in ein silikoniertes Reagenzglas gegeben und bei 37 ° C im Wasserbad aufbewahrt.

Nach einer Rotationsdauer von 5, 15, und 120 min erfolgte die Messung der dabei aufgetretenen Thrombocyten-Verminderung jeweils durch Auszählen (wie oben). Hierfür wurde ein Tropfen Blut (o.Pl.) aus dem Kolben vorsichtig auf ein paraffiniertes Uhrglas gegeben, weil die Form des Kolbens für eine direkte Entnahme ungeeignet war.

c) Versuchsgang bei der Kapillarmethode:

Etwa 20 min nach Blutentnahme am Patienten konnte mit dem parallel laufenden Versuch im Kapillarsystem begonnen werden.

Das aufbewahrte restliche Testblut (o.Pl.) wurde mit silikonierter Kanüle und Spritze aufgenommen und damit die auf 37°C erwärmte Glaskapillare in 10 cm Länge gefüllt. Das Volumen dieser Flüssigkeitssäule betrug ca. 0,1 ml (s.Anmerkung 2).

Nach einem einmaligen Durchgang zur Benetzung durchlief die Flüssigkeit nach jedem Kippen einen Weg von 26 cm unter einem konstanten Neigungswinkel von $45/2^{\circ}$. War nach Ablauf einer gewählten Strömungszeit oder nach Durchlaufen eines bestimmten Gesamtweges der Versuch

beendet, so wurde das Blut (o.Pl.) auf ein paraffiniertes Uhrglas ausgeblasen, daraus erneut die Plättchenzahl bestimmt und in Relation zum Ausgangswert gesetzt (Verminderung um d %).

Aus der ebenfalls gemessenen benötigten Zeit (bei konstantem Gesamtweg) oder dem zurückgelegten Weg (bei konstanter Strömungszeit) liess sich die Strömungsgeschwindigkeit errechnen; sie wird in den Tabellen der Einzelversuche mit angegeben.

In Vorversuchen (Tabelle 1) war ermittelt worden, dass bei dem genannten Neigungswinkel ($45/2^\circ$) mit einer Fließgeschwindigkeit von ca. 2 cm/sec in normalem Citratblut (1:4) ein Plättchenverlust von 50-70 % auftrat (bei konstant gehaltenem Strömungsweg).

Anmerkung 2: Genaue Versuchsdaten beim Kapillarversuch:
Strömungszeit = konstant = 300 sec = 5 min.

Strömungsweg = konstant = 30 Durchgänge
= (Meßstrecke - Blutsäule) x 30
= (36 cm minus 10 cm) x 30 =
= 780 cm.

Volumen der Flüssigkeitssäule V_{Kap} =
= $0,5^2 (\text{mm}^2) \cdot \pi \cdot 100 (\text{mm}) = 25 \pi (\text{mm}^3) =$
= $785 \text{ mm}^3 = 0,08 \text{ ml.}$

Neigungswinkel $\alpha/2$ Grad	Strömungs- geschwindigkeit v_{St} (cm/sec)	Thrombocyten- Verminderung (Prozent)
30	0,6	80
45	2,0	55
60	3,0	47
75	4,3	40
90	5,5	45

Tabelle 1: Plättchenverlust (= Adhäsion) und Strömungs-
geschwindigkeit im Kapillarsystem in Abhängig-
keit vom Neigungswinkel bei konstantem Strö-
mungsweg.

Mittelwerte aus je vier Einzelversuchen.

Der Neigungswinkel von $45/2$ Grad, sowie Zeit- und Weg-
konstanten, wurden für die weiteren Versuche beibehalten,
weil die so erzielte Verminderung normaler Thrombocyten
auf etwa die Hälfte ihres Ausgangswertes Spielraum liess
für die Beurteilung von thrombopathischen Störungen oder
pharmakologischen Effekten, die die Adhäsion mindern oder
mehren. Jedoch war für die Untersuchungen eher ersteres
zu erwarten.

d) Reinigung der Apparaturen:

Da die Beschaffenheit der benutzten Glasoberflächen von größter Bedeutung für die erzielten Versuchsergebnisse war, wird die Art und Weise der Reinigung eigens angegeben.

Kolben:

Nach dem Versuch zunächst mechanische Reinigung mit feiner Bürste und Wasser, dann mehrfaches Spülen mit aqua dest., Methanol (96 %) und Äther; Trocknen im Brutschrank.

Kapillare:

Durchziehen von je 20 ml aqua dest., Methanol, Äther und schliesslich 10 min lang Luft mittels Wasserstrahlpumpe.

In kürzeren Zeitabständen wurde die Kapillare für 24 std in Chromschwefelsäure gegeben, danach mit n/l NaOH neutralisiert, mit aqua dest. gründlich gespült und luftgetrocknet.

Leukocytenpipetten wurden auf sinngemäß gleiche Weise wie die Kapillare gesäubert.

Silikonisierte Kanülen, Spritzen und Gläser wurden vorsichtig mechanisch gereinigt, mit aqua dest. gespült, 60 min bei 200° C sterilisiert und, falls erforderlich, mit einem neuen Silikonfilm versehen.

C. E R G E B N I S S E

Untersuchung methodisch bedingter Fehlerquellen.

Da sich bei aerartigen Untersuchungen trotz aller Sorgfalt ein mehr oder weniger großer methodisch bedingter Fehler nicht vermeiden läßt, dessen Größe aber für die Beurteilung der Ergebnisse wichtig ist, wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

a) Fehlerbreite bei Bestimmung des Plättchenausgangswertes:

Vom gleichen, mit silikoniertem System gewonnenen Testblut (Citrat 1:4) wurden 10 Leukopipetten gefüllt und von jeder wie angegeben die Plättchenzahl bestimmt.

Vers.- zahl n	Thrombocyten- zahl a/cmm	d (%)	d ²
1	271 000	-11	121
2	283 000	-6	36
3	278 000	-8	64
4	320 000	+6	36
5	310 000	+2	4
6	342 000	+13	169
7	298 000	-2	4
8	337 000	+11	121
9	311 000	+3	9
10	319 000	+5	25

Daraus errechneter

Mittelwert M und

dessen mittlerer

Fehler F_M :

$$M = \frac{\sum a}{n} = 303\,000/\text{cmm.}$$

$$F_M = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}} = \pm 2,6 \%$$

Mittlerer Fehler f_m

der Einzelmessung:

$$f_m = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}} = \pm 8 \%$$

Tabelle 2

Bei einem anderen Versuch wurden von einer Leukocytenpipette mit Testblut fünf Kammern gefüllt und ausgezählt. Die Schwankung dieses Zählfehlers betrug $\pm 2,1 \%$ und lag innerhalb der Gesamtfehlerbreite von $\pm 2,6 \%$ (s. Tabelle 2).

b) Fehler durch Schwankungen der Thrombocytenzahl:

Bei der gleichen Person ergaben sich mit 10 Blutabnahmen (Eigenblut) innerhalb eines Zeitraumes von sechs Monaten (Jan.-Juli 1959) für die Thrombocytenzahl/cmm folgende Werte:

Vers.- zahl n	Thrombocyten- zahl a/cmm	d (%)	d ²
1	259 000	+10	100
2	245 000	+4	16
3	228 000	-3	9
4	232 000	-2	4
5	239 000	+1	1
6	250 000	+6	36
7	215 000	-9	81
8	214 000	-10	100
9	205 000	-14	196
10	245 000	+4	16

Daraus errechneter
Mittelwert M und
sein mittlerer
Fehler F_M :

$$M = \frac{\sum a}{n} = 237\,000/\text{cmm}$$

$$F_M = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n(n-1)}} = \pm 2,5 \%$$

$$f_m = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}} = \pm 8 \%$$

Tabelle 3

Die Plättchenzahl/cmm erwies sich während der genannten Zeitspanne als annähernd konstant. Ihr mittlerer Fehler von $\pm 2,5 \%$ war fast der gleiche wie der von Tabelle 2, dessen Richtigkeit sich damit bestätigte.

Da die folgenden Versuche allgemein gültige Werte liefern sollten, wurden sie mit dem Blut verschiedener Versuchspersonen durchgeführt, wobei deren individuelle Thrombocytenzahl/cmm naturgemäß variierte.

Es wurde daher in der tabellarischen Übersicht auf die Angabe absoluter Thrombocytenwerte verzichtet und nur die jeweils gemessene relative Verminderung der Plättchen (in Prozent) als Mass für ihre Adhäsivität angegeben.

Vergleichende Messung der Thrombocyten-Adhäsion.

a) Versuche mit Citrat-Blut:

Thrombocytenverminderung in Prozent (= Adhäsion)							
Vers.- zahl n	KOLBENMETHODE			KAPILLARMETHODE			
	nach 5 min	Rotationsdauer von 15 min	120 min	bei Wahl von Zeit=k	Weg=k	V Ström(cm/sec) Zeit=k	Weg=k
1	11	25	45	-	82	-	1,6
2	8	19	22	-	71	-	1,7
3	14	28	34	57	76	1,3	1,5
4	15	32	38	38	50	2,0	2,6
5	11	28	32	25	85	1,7	1,6
6	13	21	25	49	76	1,5	1,7
7	15	-	-	60	86	1,3	1,3
8	15	-	-	51	82	1,6	1,4
9	13	25	27	29	58	1,7	1,4
10	-	21	27	48	-	1,5	-
11	20	17	19	52	-	1,3	-
12	10	10	25	-	-	-	-
13	13	17	18	-	-	-	-
14	21	31	30	-	-	-	-
15	29	-	34	42	-	1,5	-
16	9	-	24	34	-	1,6	-
17	8	-	8	30	-	1,6	-
18	+2	-	23	61	-	1,6	-
19	8	-	20	22	-	1,6	-
20	4	-	8	32	-	2,2	-

Tabelle 4 : 20 Einzelversuche, durchgeführt mit Citrat-Blut (1:4) von verschiedenen, gesunden Personen.

Aus den gemessenen Einzelwerten errechneten sich die folgenden Mittelwerte und deren mittlere Fehler F_M :

Thrombocytenverminderung in Prozent (= Adhäsion)					
KOLBENMETHODE			KAPILLARMETHODE		
nach Rotationsdauer von 5min	15 min	120 min	bei Wahl von Zeit=k	Weg=k	
12	23	25	41	74	Mittelwerte
$\pm 1,5$	$\pm 1,9$	$\pm 2,2$	$\pm 3,3$	$\pm 4,4$	Mittlerer Fehler F_M

Tabelle 4a : Plättchen-Adhäsion in Citrat-Blut.

Beurteilung :

Bei den Adhäsionsversuchen im Kolbensystem ergab ein Plättchenverlust von 12 % nach fünfminütiger Rotation (5 min-Wert) noch keinen signifikanten Wert. Dagegen war nach 15 min Rotation (15 min-Wert) die Adhäsion auf das Doppelte angestiegen, aber nach 2 Stunden noch fast unverändert in dieser Höhe. Für alle Werte lag die Schwankungsbreite innerhalb des methodisch bedingten Fehlerbereiches ($\pm 2,6$ %).

Im Kapillarsystem wurde nach fünfminütiger Strömungszeit (konstant gehalten) eine Thrombocytenverminderung von 41 % gemessen.

Versuche mit konstant gewähltem Strömungsweg - nur durchgeführt zum Vergleich mit einer vorausgegangenen Arbeit (HUBRICH) - erzielten höhere Werte für die Adhäsion (74 %), die einer ungefähr verdoppelten Strömungszeit in der Kapillare entsprachen.

und $\pm 4,4$ % (bei konstantem Weg) etwas höher als der methodisch bedingte Fehler sonst.

b) Versuche mit Citrat-Plasma :

Thrombocytenverminderung in Prozent (= Adhäsion)							
Vers.- zahl n	KOLBENMETHODE			KAPILLARMETHODE			
	nach Rotationsdauer von 5 min	15 min	120 min	bei Wahl von Zeit=k	Weg=k	V Ström (cm/sec) Zeit=k	Weg=k
1	3	8	10	-	12	-	3,6
2	13	7	4	-	14	-	3,0
3	+1	-	-	-	22	-	3,2
4	9	+4	+1	-	25	-	3,4
5	+4	-	9	+1	-	3,0	-
6	+8	+9	7	10	-	3,9	-
7	-	-	-	9	-	3,6	-
8	5	8	20	14	-	3,9	-
9	3	6	8	18	-	3,6	-
10	1	0	+11	+9	-	3,7	-

Tabelle 5 : 10 Einzelversuche, durchgeführt mit Citrat-Plasma (1:9) verschiedener, blutnormaler Personen.

Anmerkung 3: Definition des Begriffes "statistisch gesichert":

Als statistisch sicher verschieden ist ein Einzelmesswert anzusehen, wenn er um das Doppelte (oder mehr) seiner mittleren Schwankungsbreite ($2 f_m$) von einem anderen entfernt liegt .

Das gleiche gilt für das Verschiedensein von Mittelwerten (Differenz von $2 F_M$ erforderlich).

Aus den Einzelwerten ergaben sich die folgenden Mittelwerte und deren mittlere Fehler:

Thrombocytenverminderung in Prozent (= Adhäsion)					
KOLBENMETHODE			KAPILLARMETHODE		
nach Rotationsdauer von 5 min	15 min	120 min	bei Wahl von Zeit=k	Weg=k	
2	2	6	7	18	Mittelwert
$\pm 2,1$	$\pm 2,6$	$\pm 3,2$	$\pm 4,2$	$\pm 3,1$	Mittlerer Fehler F_M

Tabelle 5a : Thrombocyten-Adhäsion in Citrat-Plasma.

Beurteilung:

Im Gegensatz zu den Versuchsreihen mit Citrat-Blut zeigten alle Messungen eine nur geringfügige Adhäsion.

Bei der Kolbenmethode fanden sich übereinstimmend niedrige 5 und 15 min-Werte (2%). Selbst nach einer Rotationsdauer von 2 std betrug der Plättchenverlust nur 6 %.

Bei einer Fehlerbreite von $\pm 2,1-3,2$ % ließ sich eine Adhäsion der Thrombocyten statistisch gesichert nicht nachweisen (Anmerkung 3).

Das gleiche ergab sich im Kapillarversuch, wobei nach einer Strömungszeit von 5 min die Plättchenverminderung nur 7 % betrug, jedoch statistisch unsicher ($\pm 4,2$ %) war. Erst nach längerer Strömung bei konstantem Weg erhöhte sie sich auf 18 % und war damit sicher verschieden vom Ausgangswert ($\pm 3,1$ %), jedoch nur noch ein Viertel so hoch wie im Versuch mit Citrat-Blut 1:4 (74 %).

c) Citratblut-Versuche mit Zusatz von Panthesin :

Eine 5-%ige Panthesin-Originallösung (s. Anmerkung 4) wurde mit Na-Citrat (3,8-%ig) so verdünnt, dass diese Lösungen, vermischt mit Blut im Verhältnis 1:4, die angegebenen Panthesin-Konzentrationen (50 und 100 mg%) enthielten. Bei den folgenden Versuchen mußte aus versuchstechnischen Gründen im Kolbensystem auf die Bestimmung des 15 min-Wertes verzichtet werden.

Thrombocytenverminderung in Prozent (= Adhäsion)								
KOLBENMETHODE					KAPILLARMETHODE			
Vers: zahl n	50 mg% P. nach Rotationszeit von		100 mg% P. nach Rotationszeit von		50 mg%	100 mg%	v Strömung	
	5 min	120 min	5 min	120 min	bei Zeit=k	Zeit=k	v 50	v 100
1	9	16	5	10	18	17	1,5	1,7
2	17	3	+4	1	12	18	2,2	2,2
3	1	4	5	14	12	3	2,0	2,0
4	+2	4	4	13	26	11	2,0	2,3
5	+5	11	9	10	7	2	2,3	1,7
6	3	10	0	+1	6	10	2,0	3,2

Tabelle 6 : 6 Einzelversuche mit Citratblut von verschiedenen, gesunden Personen unter Zusatz von Panthesin durchgeführt.

Anmerkung 4: Chemie des Panthesins:

Es ist die Firmenbezeichnung für die chemische Substanz
p-Aminobenzoyl-N-diaethyllleucinol-methansulfat.

Die folgende Tabelle gibt die aus den Einzelversuchen errechneten Mittelwerte und deren mittlere Fehler an.

PANTHESIN-Konzentr. (mg%)	Thrombocytenverminderung in Prozent		
	KOLBENMETHODE		KAPILLARMETHODE
	5 min-Wert	120 min-Wert	Zeit=konst.
50	4 ($\pm 3,3$)	8 ($\pm 2,2$)	14 ($\pm 3,1$)
100	3 ($\pm 1,8$)	8 ($\pm 2,6$)	10 ($\pm 2,8$)

Tabelle 6a : Wirkung von Panthesin auf die Plättchen-Adhäsion in Citrat-Blut.

Beurteilung:

Unter dem Einfluß von Panthesin zeigten die Thrombocyten gegenüber Normalblut eine signifikant verminderte Adhäsion. Mit der Kolbenmethode ließ sich eine geringe Adhäsivität der Plättchen erst nach 120 min nachweisen. Eine unterschiedliche Wirkung verschiedener Konzentrationen war nicht mehr messbar.

Der adhäsionsmindernde Effekt konnte mit der Kapillarmethode deutlicher beobachtet werden; auch Konzentrationsunterschiede waren erfassbar. Der Wert für die Adhäsion lag mit 14 % (bei 50 mg% P.) und 10 % (bei 100 mg% P.) sicher verschieden vom ca. viermal so hohen Normalblutwert (41 %).

Bei einer Fehlerbreite von ca. ± 3 % waren die gemessenen Werte noch als Restadhäsivität erkennbar.

D. Z U S A M M E N F A S S U N G

Nach zwei verschiedenen Methoden wurde die Adhäsion von Thrombocyten in Citrat-Blut, in Citrat-Plasma und unter dem Einfluss von Panthesin vergleichend gemessen.

Dazu wurde die Testflüssigkeit einmal in einer Kapillar-Apparatur (nach R.MARX-DERLATH), im anderen Falle in einem rotierenden Glaskolben (nach J.JÜRGENS) bei 37°C zum Strömen gebracht. Der dabei nach einer bestimmten Zeit jeweils aufgetretene Plättchenverlust diente prozentual umgerechnet als Maß für die Adhäsivität (s. Tabelle 7).

Im einzelnen ergab sich bei Benutzung des Kolbensystems folgendes:

Die Klebrigkeit normaler Citrat- B l u t - Thrombocyten war nach fünfminütiger Rotation eben nachweisbar und erhöhte sich nach zweistündigem Rotierenlassen auf 25 %.

Entfernte man Erythrocyten und Leukocyten durch schonendes Zentrifugieren und führte die gleichen Versuche mit Citrat- P l a s m a durch, so ließ sich ein s t a t i - s t i s c h g e s i c h e r t e r Plättchenverlust erst nach zweistündiger Rotationszeit eben nachweisen.

Zusatz von P a n t h e s i n zu Citratblut in vitro (50 mg%) hob die normalerweise beobachtete Adhäsion der Plättchen nahezu auf. Eine Rest-Adhäsivität war erst nach einer Rotationsdauer von 2 std gerade messbar. Verdoppelung der Konzentration (100 mg%) ergab den gleichen Effekt.

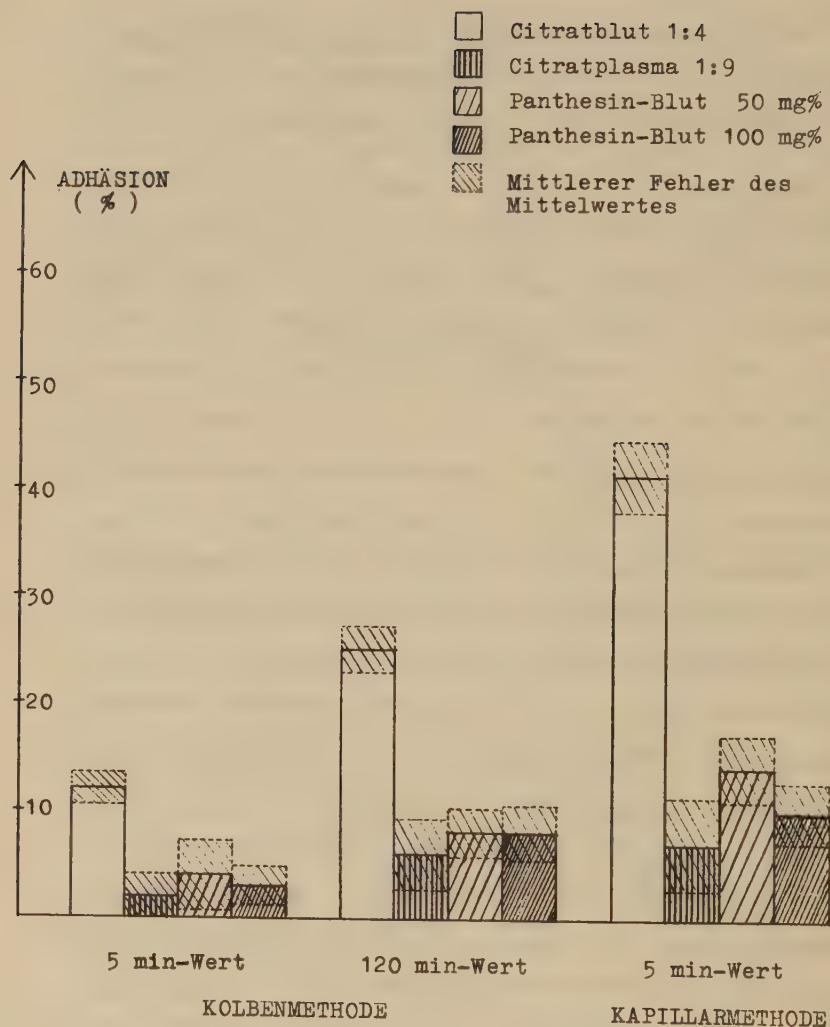


Tabelle 7 : Graphische Zusammenstellung der gesamten Versuchsergebnisse (Mittelwerte).

Parallel laufende Versuche mit der KAPILLARMETHODE ergaben für Citrat - B l u t bei konstanter Strömungszeit (5 min) eine Thrombocytenverminderung um 40 %, die bei ungefährrer Verdoppelung der Strömungszeit auf über 70 % anstieg.

Bei Untersuchung von Citrat - P l a s m a liess sich nach fünfminütigem Strömen keine sichere Adhäsion der Plättchen beobachten. Erst bei Verlängerung der Strömungszeit war sie sicher vorhanden, jedoch viermal niedriger als beim Versuch mit Blut.

Die Wirkung von P a n t h e s i n auf Citratblut-Thrombocyten trat als signifikante Verminderung der Adhäsion auf ca. ein Viertel des Normalwertes in Erscheinung . Konzentrationsunterschiede (50 und 100 mg% P.) waren als unterschiedlich hohe Restadhäsivität (10 und 14 %) noch erfassbar.

Die Berechnung der mittleren Fehlerbreiten für die M i t t e l - Werte ergab, dass sie sich mit $\pm 1,5 - 3,3$ % bei Benutzung des Kolbensystems und $\pm 2,8 - 4,4$ % bei der Kapillarmethode um den methodisch bedingten Fehler (bei Bestimmung des Thrombocyten-Ausgangswertes auftretend) von $\pm 2,6$ % bewegten.

Die mittlere Fehlerbreite der E i n z e l - Messungen lag mit $\pm 6 - 13$ % um die des Ausgangswertes von ± 8 %.

E. DISKUSSION

Vergleich beider Methoden.

Ziel der Untersuchungen war es, zu einem vergleichenden Urteil über die benutzten Methoden zu gelangen.

Das Kolbensystem erbringt eine relativ niedrige "Standard-Adhäsion", das heisst eine nicht sehr hohe Thrombocytenverminderung bei Versuchen mit normalem Citratblut. Sie beträgt nur 12 % beziehungsweise 23 % (5 min- und 15 min-Wert). Es besteht also nur ein kleiner Messbereich ($0 - 12_{5,-} 23_{15},\%$) für den Nachweis adhäsionsverändernder, insbesondere -mindernder Effekte. Dagegen wäre die Methode allenfalls zur Erfassung starker Erhöhungen der Plättchenklebrigkeit geeignet.

Anmerkung 5: Relation von Testflüssigkeit-Volumen (TV) zu benetzter Gesamtoberfläche (BO):

1.) Kolben:

TV = 2 ml;

a) in Ruhe:

$$BO = 2\pi r h_1 = 2\pi \cdot 1,4 \text{ (cm)} \cdot 0,5 \text{ (cm)} = 1,4\pi \text{ cm}^2;$$

$$TV:BO = 2:1,4\pi \approx 1:2.$$

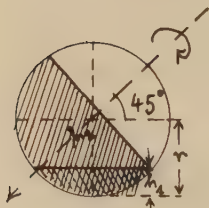
b) bei 30 U/min: TV = 2ml; $v_{St} = \text{konst};$

$$\begin{aligned} BO &= \text{benetzte Kugelzone} = 2\pi r h_2 U/\text{min} \\ &= 2\pi r^2 \cdot U/\text{min} \text{ (für } h_2 = r \text{)} \\ &= 2\pi \cdot 1,96 \text{ (cm}^2\text{)} \cdot 30 = 120\pi. \end{aligned}$$

Für Rotationszeit 5min: $TV:BO = 2 : 600\pi \approx 1:900.$

" " 15min: $TV:BO = 2 : 1800\pi \approx 1:2700.$

" " 120min: $TV:BO = 2 : 14400\pi \approx 1:23000.$



Beim Kapillar-Adhäsionsmeter liegt bei etwa gleicher Versuchsdauer die "Standard-Adhäsion" um ca. das Dreifache höher und ist durch längere Strömungszeit gut anzuheben. Der größere Meßbereich des Systems ($0 - 41_5, - 74_{10}, \%$) lässt dieses deutlicher ansprechen

Ursache dafür ist möglicherweise der zwischen beiden Systemen bestehende Unterschied in der Relation "Testflüssigkeit-Volumen (TV) zu benetzter Gesamtoberfläche (BO)".
(S. Anmerkung 5).

2.) Kapillare:

TV $\approx$ 0,1 ml; v_{St} = Funktion der Viskosität; (bei konstantem Neigungswinkel)
 $r = 0,5$ mm; $v_{Blut} = 1,6$ cm/sec (mittlere);
 $h = 100$ mm; $v_{Plasma} = 3,6$ cm/sec " ;

a) in Ruhe: $BO = 2\pi r h = 2\pi \cdot 0,5 \text{ (mm)} \cdot 100 \text{ (mm)} =$
 $= 100 \pi \text{ mm}^2 = \pi \text{ cm}^2;$

TV : BO = $0,1 : \pi \approx \underline{\underline{1 : 3,14}}$.

b) bei Strömungszeit = konst. = 5 min:

$BO_{Blut} = 2\pi r v_{Blut} \cdot t =$
 $= 2 \cdot 0,5 \text{ (mm)} \cdot \pi \cdot 16 \text{ (mm/sec)} \cdot 300 \text{ (sec)} =$
 $= 4800 \pi \text{ mm}^2 = 48 \pi \text{ cm}^2;$

TV : $BO_{Blut} = 0,1 : 48 \pi \approx \underline{\underline{1 : 1500}}$.

$BO_{Plasma} = 2\pi r \cdot v_{Plasma} \cdot t =$
 $= 2 \cdot 0,5 \text{ (mm)} \cdot \pi \cdot 36 \text{ (mm/sec)} \cdot 300 \text{ (sec)} =$
 $= 10800 \pi \text{ mm}^2 = 108 \pi \text{ cm}^2;$

TV : $BO_{Plasma} = 0,1 : 108 \pi \approx \underline{\underline{1 : 3393}}$.

c) bei Strömungsweg = konst. = 36 cm · 30 :

$BO = 2\pi r s = 2 \cdot 0,5 \text{ (mm)} \cdot \pi \cdot 360 \text{ (mm)} \cdot 30 =$
 $= 10800 \pi \text{ mm}^2 = 108 \pi \text{ cm}^2;$

TV : BO = $0,1 : 108 \pi \approx \underline{\underline{1 : 3393}}$

Dieses Verhältnis (TV:BO) beträgt für den Kolben in Ruhe 1:2 gegenüber 1:30 bei der Kapillare. Durch Bewegung der Systeme vergrößert sich die benetzte Gesamtoberfläche proportional der Strömungsgeschwindigkeit, die im Kolben durch dessen Eigendrehung konstant, in der Kapillare von der Viskosität abhängig ist (bei konstantem Neigungswinkel). Nach fünfminütiger Versuchsdauer betragen die Relationen TV:BO ca 1:900 (Kolben) und ca. 1:1500 (Kapillare). Längere Rotation im Kolben lässt zwar die benetzte Gesamtoberfläche linear ansteigen, jedoch nicht die Adhäsion der Thrombocyten, da die Kontaktfläche allmählich von ihnen "besetzt" zu sein scheint.

Bei der Kapillarmethode wird also eine relativ kleine Zahl von Plättchen mit einer relativ großen Oberfläche in Kontakt gebracht; damit verbunden ist allerdings eine etwas größere Fehlerbreite.

Ein weiterer Nachteil der Kapillare besteht darin, dass sie mechanisch nicht zu säubern ist und bei unzureichender chemischer Reinigung Fehlbestimmungen unterlaufen können. Jedoch wiegen alle diese Nachteile nicht den Vorteil signifikanter Versuchsergebnisse durch den großen Messbereich auf. Es wurde versucht, die "Standard-Adhäsion" im Kolbensystem durch Zaponierung der Oberfläche heraufzusetzen; dies scheiterte jedoch daran, dass sich während der Rotation die Zaponfolie ablöste und große, makroskopisch sichtbare Agglutinate auftraten. Vielleicht liesse sich durch Verwendung anderer Glasarten oder durch

Aufbringen anderer oberflächenaktiver Schichten eine Messbereicherweiterung erreichen.

Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Autoren.

Zum Vergleich von Ergebnissen ist die völlige oder wenigstens sinngemäße Übereinstimmung der Versuchsbedingungen erforderlich.

Deshalb wurde für unsere Versuche mit Citrat-Plasma in der Kolbenapparatur die von JÜRGENS und BELLER angegebene Versuchsanordnung übernommen.

Die beiden Autoren geben dabei für eine Rotationszeit von 5 min einen Plättchenverlust von 40-60 % an, während wir nur eine Adhäsion von 2 % (bzw. 6 % nach 120 min) feststellten, das heisst keinen sicheren Plättchenverlust fanden.

Auch eine von den Autoren beschriebene "durch Flockung makroskopisch erkennbare Agglomerationsneigung nach 4-8 min" konnte bei den von uns eingehaltenen Bedingungen nicht beobachtet werden.

HUCHISON, STARK und CHAPMAN berichten, dass bei ihren Plasma-Versuchen in silikonierten Zentrifugengläsern, gedreht durch einen matburn-Mixer (30 U/min) die "Plättchen-Halbzeit" (= benötigte Zeit zur Thrombocytenverminderung auf 50 %) 90-210 min betragen habe. Allerdings wurden diese Versuche in einem Kühlsystem bei 4°C durchgeführt, im Gegensatz zu unserer Versuchstemperatur von 37°C.

Nach unseren Beobachtungen dürfte der dort angegebene

Plättchenverlust weniger durch Adhäsion als allenfalls durch Sedimentation im silikonierten (!) Zentrifugenglas bei langsamer Rotation aufgetreten sein.

Prinzipielle Übereinstimmung zeigen unsere Ergebnisse mit anderen am Kapillarsystem durchgeführten Versuchen (HUBRICH). Die Autorin stellte fest, dass die gemessene Thrombocyten-Adhäsion von der Anwesenheit aller Blutkörperchen massgebend abhängig sei und zwar in der Weise, dass die Klebrigkeit durch Entzug von Erythrocyten und Leukocyten weitgehend zum Verschwinden gebracht werden könne und nach deren Zusatz wieder auftrete.

Dieses Phänomen konnten wir insofern bestätigen, als sich auch bei unseren Versuchen mit der Kapillarmethode eine hohe "Standard-Adhäsion" erzielen liess, während der bei Verwendung von Citrat-Plasma beobachtete Plättchenverlust eben messbar war. Mit der Kolbenmethode ergab sich, wenn auch weniger ausgeprägt, das gleiche.

Übereinstimmend berichten verschiedene Autoren über die adhäsionsmindernde Wirkung des Panthesins.

H. KREITER beobachtete mit anderer Methode eine weitgehende Aufhebung der Plättchenadhäsivität durch Panthesin-Zusatz. Er führte seine Versuche mit Konzentrationen von 50 und 100 mg% P. in vitro auf Zaponlack-Oberflächen bei Zimmertemperatur durch.

Nach i.v. Injektion von Panthesin in bestimmten Konzentrationen konnte HUBRICH am Kaninchen eine signifikante Abschwächung der Thrombocytenhaftfähigkeit mit der Kapillar-

methode nachweisen.

So besteht die Möglichkeit, dass die thrombocytotrope Wirkung des Panthesin allenfalls einen Faktor im Wirkungsmechanismus der Thrombembolie-Behandlung mit Panthesin (Hydergin) darstellt (KLAUSGRABER u.a.).

Weitere Tierversuche und Prüfungen am Menschen sind notwendig, um zu erfassen, ob die praktisch-therapeutisch in Betracht kommenden Panthesindosen die Thrombocyten-Adhäsion signifikant beeinflussen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass zur Messung der Thrombocyten-Adhäsion der Kapillarmethode der Vorzug gegenüber der Kolbenmethode gegeben werden sollte, da der Messbereich des Kapillar-Adhäsimeters größer und je nach Bedarf auch leicht variierbar ist. Jedoch sollten beide im Rahmen statistischer Gruppenuntersuchungen Verwendung finden.

Als ideales Adhäsimeter könnte man sich eine Art Herz-Lungen-Maschine en miniature denken, die mit besonders gearteten Kontaktoberflächen versehen, eindeutige Aussagen über die Plättchenadhäsion unter Berücksichtigung verschiedenster Strömungsverhältnisse erlauben könnte.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- HUBRICH, I. Modellversuche zur Pathogenese der
Thrombose vom Gesichtspunkt der Throm-
bocytenadhäsion. Diss. München (1958)
- HUCHISON, H.E.,
STARK, J.M. und
CHAPMAN, J.H. Platelet Serotonin and normal Haemo-
stasis.
- JÜRGENS, J. und
BELLER, E.K. Klinische Methoden der Blutgerinnungs-
Analyse. Thieme-Verl. Stuttgart (1959)
- KLAUSGRABER, F. Die Behandlung der thrombotischen Ge-
fässerkrankungen mit Panthesin.
Wien.Med.Wochenschr. 45, 945 (1956)
- KREITER, H. Das Thrombocyten-Metamorphogramm.
Diss., München (1958)
- MARX, R. Hämostaseologie.
Habilitationsschrift, München (1953)
- MARX, R. und
DERLATH, S. Über eine Methode zur vergleichend quan-
titativen Bestimmung der Thrombocyten-
Adhäsivität
Zeitschr. Blut ,Bd.3, 247 (1957)
- RAPPERT, R. Die Grundlagen der Behandlung der Throm-
bose mit Panthesin. (1954)
Thrombose und Embolie, I.Int.Tagung,Basel
- WACKER-Chemie Pers.Zuschr. über Silikonierung (1958)
- WRIGHT, H.P. Journ. Path. Bact. 53, 255 (1941)

Herrn Professor Dr. H. S c h w i e g k danke ich für die
Übernahme des Referates.

Herrn Oberarzt Privatdozent Dr. R. M a r x möchte ich für
die Überlassung des Themas und dafür, dass er mich im Ver-
lauf der experimentellen Arbeit stets bereitwillig unter-
stützte, sehr herzlich danken.

LEBENS LAUF

Am 1. Juni 1935 wurde ich, Eva K ö h l ,geb. Peltz, in Löbnitz im Erzgebirge geboren. Mein Vater, Dr.med.Theodor Peltz, war dort als praktischer Arzt tätig.Er ist seit 1942 in Russland vermisst.Meine Mutter, Helene Peltz,geb. Schulte, wohnt seit der Flucht unserer Familie aus der Sowjetzone im Frühjahr 1953 in Iserlohn/Westfalen.

Nach obligatorischer achtjähriger Volksschulzeit besuchte ich von 1949 bis 1953 die Ernst Schneller-Oberschule in Aue/Sachsen.Meine Schulausbildung schloss ich 1955 an der Viktoria-Luise-Oberschule in Hameln/Weser mit der Reifeprüfung ab.

Das Medizinstudium begann ich im Sommer 1953 an der Universität Tübingen und beendete dort auch mit bestandener ärztlicher Vorprüfung im Juli 1957 die vorklinische Studienzeit.

Nach einem anschliessenden Semester an der Freien Universität Berlin war ich seit dem Sommersemester 1958 an der Universität München immatrikuliert. Dort habe ich im Dezember 1960 das medizinische Staatsexamen abgelegt.

